



(51) МПК

*A61K 38/47* (2006.01)*C07K 17/14* (2006.01)*B01J 20/02* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005121840/15, 11.07.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
11.07.2005

(45) Опубликовано: 20.02.2007 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2209665 C1, 10.08.2003. RU 2077475  
C1, 20.04.1997. SU 1503875 A1, 30.08.1989. US  
4335086, 15.06.1982. HJERTEN S., LINDBERG  
J., SHOPOVA B. "HIGH-PERFORMANCE  
ADSORPTION CHROMATOGRAPHY OF  
PROTEINS ON 2-MICRON SPHERICAL BEADS OF  
HYDROXYAPATITE", J. Chromatogr., 1988 May 25;  
440:305-13. SPENCER M. "AN OCTACALCIUM  
PHOSPHATE INTERMEDIATE IN THE (см. прод.)

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая,  
24, Коми научный центр УрО РАН, патентный  
отдел

(72) Автор(ы):

Донцов Андрей Геннадиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения Российской академии  
наук (RU)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АФФИННОГО АДСОРБЕНТА ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии ферментных препаратов, может быть использовано для очистки и фракционирования целлюлолитических ферментов и касается способов получения аффинного адсорбента. Способ заключается в химическом

присоединении к поверхности гидроксиапатита субстрата целлюлаз, например натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. Изобретение обеспечивает получение аффинного адсорбента с высокой избирательностью адсорбции. 2 н.п. ф-лы, 1 табл.

(56) (продолжение):

SYNTHESIS OF CHROMATOGRAPHIC HYDROXYAPATITE", Biochim. Biophys. Acta, 1980 Mar 3; 628(2):244-8.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 293 571** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.

**A61K 38/47** (2006.01)

**C07K 17/14** (2006.01)

**B01J 20/02** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2005121840/15, 11.07.2005**

(24) Effective date for property rights: **11.07.2005**

(45) Date of publication: **20.02.2007 Bull. 5**

Mail address:

**167982, g.Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja,  
24, Komi nauchnyj tsentr UrO RAN, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Dontsov Andrej Gennadievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra  
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (RU)**

(54) **METHOD FOR PRODUCTION OF AFFINITY ADSORBENT FOR CELLULOLITIC ENZYME FRACTIONATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology of enzyme preparations for purifying and fractionation of cellulolytic enzymes.

SUBSTANCE: invention relates to method for production of affinity adsorbent. Claimed method includes chemical attachment of cellulase

substrates, such as carboxymethyl cellulose sodium salt to hydroxyapatite surface.

EFFECT: affinity adsorbent of high adsorption selectivity.

2 cl, 4 ex, 1 tbl

RU 2 2 9 3 5 7 1 C 1

RU 2 2 9 3 5 7 1 C 1

Изобретение относится к области биотехнологии ферментных препаратов, может быть использовано для очистки и фракционирования целлюлолитических ферментов и касается способа получения аффинного адсорбента на основе гидроксиапатита.

Известен способ получения гидроксиапатита (прототип), включающий стадию получения  
5 брусита ( $\text{CaHPO}_4$ ) путем медленного сливания 0.5М растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (по 2 л), фильтрование брусита, его 4-кратную промывку тремя литрами воды, обработку суспензии брусита в 3 л воды 100 мл 40%-ного  $\text{NaOH}$  при кипячении в течение 1 часа (нагрев 45 мин) при постоянном медленном перемешивании, отделение гидроксиапатита от  
10 очень мутного супернатанта фильтрованием, 4-кратную промывку гидроксиапатита тремя литрами воды, 2-кратную обработку 0.01М фосфатным буфером (рН 6.8) при нагревании до 100°C и 2-кратную обработку 0.001М фосфатным буфером (рН 6.8) при кипячении в течение 15 мин (Справочник биохимика: Пер. с англ. / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. - М.: Мир, 1991. - С.463).

Недостатками адсорбента, получаемого по данному способу, является низкая  
15 избирательность адсорбции целлюлолитических ферментов. Поэтому при фракционировании экзо- и эндоглюканаз на колонках необходимо использовать ступенчатый или линейный градиент концентрации буфера, а при разделении экзо- и эндоглюканаз с помощью адсорбции в объеме - ступенчатую промывку адсорбента, что усложняет процесс фракционирования.

20 Технический результат настоящего изобретения заключается в получении аффинного адсорбента на основе гидроксиапатита с высокой избирательностью адсорбции экзоглюканаз.

Технический результат достигается путем химического присоединения к поверхности  
25 гидроксиапатита субстрата целлюлолитических ферментов, например натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы.

Способ осуществляют следующим образом. Проводят стадию получения брусита путем медленного сливания растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  аналогично тому, как это описано в прототипе. Для получения аффинного адсорбента к суспензии брусита добавляют раствор  
30 натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) в пропорции от 2:1 до 1:1 по сухому веществу, доводят рН среды до 13.0 раствором гидроксида натрия и нагревают реакцию смесь в кипящей водяной бане в течение 1 часа при постоянном медленном перемешивании.

Для получения аффинного гидроксиапатита (адсорбента) может быть использован кристаллический гидроксиапатит. В этом случае предварительно проводят его активацию  
35 путем обработки орто-фосфорной кислотой при рН среды от 4.0 до 4.5.

При нагревании брусита в сильнощелочной среде в присутствии Na-КМЦ происходит образование гидроксиапатита, при этом гидроксильные группы Na-КМЦ включаются в его кристаллическую решетку. Это приводит к присоединению Na-КМЦ к поверхности гидроксиапатита. Поперечная сшивка частиц гидроксиапатита полимерными цепями Na-  
40 КМЦ способствует образованию ограниченно набухающего в воде материала.

Пример 1. К 1470.6 см<sup>3</sup> 0.5М раствора  $\text{CaCl}_2$  медленно приливают при перемешивании 1470.6 см<sup>3</sup> 0.5М раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (стехиометрический выход брусита 100 г). Брушит отфильтровывают, проводят его 4-кратную промывку тремя литрами воды и суспендируют  
45 в 1.0 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды. К суспензии брусита приливают 500 см<sup>3</sup> раствора Na-КМЦ с массовой концентрацией 100 г/дм<sup>3</sup>, перемешивают в течение 10 минут, после чего добавляют 40%-ный раствор гидроксида натрия до установления рН среды 13.0. Смесь помещают в кипящую водяную баню и выдерживают в течение 1 часа до осаждения целевого продукта и получения прозрачной надосадочной жидкости. Образовавшуюся  
50 массу отделяют от раствора центрифугированием или фильтрованием, высушивают при 110°C и размалывают.

Пример 2. Аналогично примеру 1, добавляя к суспензии брусита 1000 см<sup>3</sup> раствора Na-КМЦ с массовой концентрацией 100 г/дм<sup>3</sup>.

Пример 3. К суспензии 100 г гидроксиапатита (фракция от 100 до 250 мкм) в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды приливают раствор ортофосфорной кислоты до установления pH среды от 4.0 до 4.5 и перемешивают в течение 10 минут для активации гидроксиапатита. Далее приливают 500 см<sup>3</sup> раствора Na-КМЦ с массовой концентрацией 100 г/дм<sup>3</sup>, перемешивают в течение 10 минут, после чего добавляют 40%-ный раствор гидроксида натрия до установления pH среды 13.0. Смесь помещают в кипящую водяную баню и выдерживают в течение 1 часа до осаждения целевого продукта и получения прозрачной надосадочной жидкости. Образовавшуюся массу отделяют от раствора центрифугированием или фильтрованием, высушивают при 110°C и размалывают.

Пример 4. Аналогично примеру 3, добавляя к суспензии гидроксиапатита после активации 1000 см<sup>3</sup> раствора Na-КМЦ с массовой концентрацией 100 г/дм<sup>3</sup>.

Емкость адсорбентов по эндо- и экзоглюканазам определяют адсорбцией в объеме. Для этого порцию раствора ферментного препарата Целловиридин Г20х после диафильтрации против 2000 дм<sup>3</sup> 0.01М ацетатного буфера обрабатывают навеской адсорбента при перемешивании в течение 30 мин и 4°C. Адсорбент отфильтровывают и определяют активности ферментов в растворах. Емкость адсорбентов по эндо- и экзоглюканазам рассчитывают по разности суммарных активностей растворов до и после обработки.

Единица эндоглюканазной активности соответствует количеству фермента, приводящему к снижению относительной вязкости 0.3%-ного раствора Na-КМЦ, равному 1 мин<sup>-1</sup>, при pH 4.5 и 30°C.

Единица экзоглюканазной активности соответствует количеству фермента, приводящему к расщеплению хроматографической бумаги с образованием 1 мг глюкозы за 1 час при pH 4.5 и 50°C. Характеристики адсорбентов, полученных по примерам 1-4, приведены в таблице 1.

Таблица 1						
Пример	Выход, % от массы адсорбента	Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup>	Набухаемость*, см <sup>3</sup> /г	Фильтрующие свойства**, мл/см <sup>2</sup> ×час	Емкость по эндоглюканазе, ед/г	Емкость по экзоглюканазе, ед/г
1.	124.3	0.89	5.85	76.6	-	212.3
2.	142.3	0.9	9.78	62.7	-	238.0
3.	117.3	0.77	8.67	47.5	-	243.8
4.	133.7	0.78	12.97	44.0	-	271.5
прототип	-	0.77	1.43	5.6	4432.0	206.3

\* - в дистиллированной воде при pH 6.0;  
 \*\* - скорость свободного истечения 0.01М ацетатного буфера pH 4.7 через слой адсорбента площадью 1 см<sup>2</sup> и высотой 1 см (мл/см<sup>2</sup>×час).

#### Формула изобретения

1. Способ получения аффинного адсорбента для фракционирования целлюлолитических ферментов, предусматривающий получение брушита из кальция хлорида, путем обработки его гидрофосфатом натрия, фильтрование брушита, его 4-кратную промывку водой и суспендирование в дистиллированной воде, отличающийся тем, что суспензию брушита обрабатывают раствором Na-КМЦ при массовом соотношении от 2:1 до 1:1, перемешивают в течение 10 мин, после чего добавляют 40%-ный раствор гидроксида натрия до установления pH 13, с последующим кипячением смеси в течение 1 ч до осаждения целевого продукта, отделением его и высушиванием.

2. Способ получения аффинного адсорбента для фракционирования целлюлолитических ферментов, отличающийся тем, что кристаллический гидроксиапатит суспендируют в дистиллированной воде, активируют раствором ортофосфорной кислоты при pH от 4,0 до 4,5, перемешивают в течение 10 мин, обрабатывают раствором Na-КМЦ при массовом соотношении 2:1 до 1:1, перемешивают в течение 10 мин, после чего добавляют 40%-ный раствор гидроксида натрия до установления pH 13, с последующим кипячением смеси в течение 1 ч до осаждения целевого продукта, отделением его и высушиванием.